

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

C12Q 1/68

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01132232.2

[43]公开日 2002年8月7日

[11]公开号 CN 1362527A

[22]申请日 2001.11.19 [21]申请号 01132232.2

[71]申请人 复旦大学

地址 200032 上海市医学院路 138 号

[72]发明人 熊思东 叶巍 陈习武 储以微

[74]专利代理机构 上海正旦专利代理有限公司

代理人 吴桂琴

权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图页数 2 页

[54]发明名称 一种定量检测趋化因子表达水平的方法

[57]摘要

本发明属生物技术领域,本发明通过构建含有与 LARC 特异性引物互补序列的特定内参照质粒,以同一对引物在同一反应管中竞争扩增 LARC,从而对 LARC 的表达水平进行定量,建立了定量检测趋化因子 LARC 表达水平的 cQRT-PCR 技术。并通过对 LARC 水平、HBV 不同感染状态下体外培养细胞及病人活检肝组织标本中 LARC 表达量的测定,验证了本方法具备了较高的可性和准确性,本方法可用于某些疾病如慢性乙肝等疾病的诊断、预后判断及各种治疗和预防效果的评价。

ISSN 1008-4274

知识产权出版社出版



权利要求书

1. 一种定量检测趋化因子表达水平的方法，其特征是通过构建含有特定内参照质粒 PAL-2-IS.4，以同一对引物在同一反应管中竞争扩增，建立对趋化因子的表达水平的竞争性定量检测方法。
2. 按权利要求 1 所述的方法，其特征是所述的趋化因子为 LARC。
3. 按权利要求 1 所述的方法，其特征是所述的内参照质粒 PAL-2-IS.4 与 LARC 特异性引物互补序列，该质粒 DNA 内含比野生型 sLARC 大 42bp、其 5'和 3'末端序列与 LARC 基因的 5'和 3'末端序列同源的特定基因序列。
4. 按权利要求 1 所述的方法，其特征是按以下步骤进行：
 - a) 从 HepG₂.2.2.15 细胞中扩增得目的基因 LARC，以 T₄DNA 连接酶克隆到载体 pBS-VH62-ANK 质粒中，以 P₁/P₃为引物，从新质粒中扩增出 324bp 的目的基因 LARC；再以 EcoR I 对质粒行酶切，目的基因插入到空载体 pBS-VH62-ANK 中构建成 PAL-2 质粒，其中 P-pBS, A-ANK, L-LARC, 2-HepG₂.2.2.15；
 - b) 构建及鉴定 PAL-2-IS.4 质粒，取人工合成的一对互补的 42bp 外源性核酸片段 IS，退火后形成 Afl III 粘性末端，以连接酶克隆到 PAL-2 中，得质粒 PAL-2-IS 后，以 P₁/P₃为引物对质粒进行鉴定，经测序确认新质粒已插入了 IS 片段，得内对照质粒 PAL-2-IS.4
 - c) 建立检测 LARC 表达的竞争性 RT-PCR 技术，以 PAL-2 与 PAL-2-IS.4 共扩增，产物经琼脂糖凝胶电泳，紫外成像凝胶处理系统扫描分析，根据各扩增条带的光密度值，用光密度比值法，得直线回归方程 $y=ax+b$ ，
 - d) 验证本发明方法的准确性。1) 检测 HBV 不同感染状态下 LARC 表达水平，2) 检测正常及慢性肝炎活检肝标本中 LARC 表达量。
5. 按权利要求 4 的方法，其特征是所述的 P₁/P₃引物，其中 P2 序列：5' GTC GAA TTC CAT TCT AGA AAA GCC ACA G 3'， P3 序列：5' CGG AAT TCC CAT GTG CTG TAC CAA G 3'。



说明书

一种定量检测趋化因子表达水平的方法

技术领域

本发明属生物技术领域，涉及一种定量检测趋化因子 LARC 表达水平的方法，和构成本发明方法的关键内对照质粒。

背景技术

随着 PCR (Polymerase Chain Reaction) 技术在基础研究、临床诊断等各个领域的广泛应用，人们逐渐意识到仅仅停留在 PCR 的定性应用上的诸多局限性。生命科学研究，已超出了最初“有/无”的简单的定性范围，而需要更精准的“多/少”的定量概念。以 HIV、HBV、HCV 等病毒研究为例，定量 PCR 检测病毒基因，可协助判断潜伏的感染者及无症状携带者的情况，并可从测定结果来判断药物的治疗效果、推测复发的可能性；至于 mRNA 的 RT-PCR 定量更能进一步反映病毒的转录水平、活动性、复制性等指标。

LARC (Liver and Activation-Regulated Chemokine) 是 1997 年日本学者 Hieshima 发现并鉴定的一个新的 CC 类趋化蛋白。LARC 在生理状态下在人肝脏中有一定水平的表达，是肝脏中的一看家趋化蛋白；LARC 可趋化活化 T 淋巴细胞、记忆 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞等免疫活性细胞表面，在乙肝病毒感染的病毒特异性细胞免疫，尤其是 CTL 杀伤肝细胞、清除病毒的免疫应答过程中有重要的角色。LARC 的表达水平与其相关疾病如乙型肝炎的免疫状态、转归、预后等的判断具有重要意义。由于 LARC 与大多数趋化蛋白一样，具有瞬时分泌、含量微弱、局部表达、而不进入循环等特点，无法用传统的定量方法对其进行精确的定量，所以，需要建立一个良好的分子水平的定量系统，对 LARC 转录及翻译进行较为准确的定量，用较为精准的量化概念反映该分子的表达水平。

目前常用的对趋化因子进行定量的方法有酶联免疫吸附试验 (ELISA)、免疫组织化学实验和定量 RT-PCR/PCR 法等。其中 ELISA 方法较为迅速简便，但需要体液如血清、分泌物等为检测对象，且精确度和敏感性较差，而趋化蛋白恰恰又是一种分泌水平相对微弱的蛋白质，这势必限制了该方法的应用。免疫组化实验能直观地对趋化蛋白的表达进行定位、定量研究，但对抗体的要求较高，且仅局限于对一

些胞内分泌型趋化蛋白的检测,而大多数趋化蛋白往往具有广泛弥散性分泌的特点。定量 PCR 技术是根据 PCR 的产物量来推断其原始模板量的方法。常用的定量方法主要有外标法(external standard)、内标法(internal standard)和实时荧光法(real time)三种。外标法具有操作简便、快速等特点,但由于 PCR 反应是一指数变化过程,反应过程中任一参数如模板起始量、引物浓度、DNA 聚合酶活性、反应温度、循环时间、循环数等的微小变化都会显著改变终产物的量,反应前几个循环的不均一性、各反应管不同的升降温效率等将造成无法避免的管间差异,使定量结果的可靠性大为降低。内标法是在定量系统中设立内参照,将参照基因与待测基因在同一反应管内共同进行扩增,这样可在很大程度上消除“管间差异”带来的误差。

发明内容

本发明的目的是建立能对 LARC 转录及翻译水平进行相对精确的定量 cQRT-PCR 系统,用较为准确的量化概念反映 LARC 的表达水平。

本发明通过构建含有与 LARC 特异性引物互补序列的特定内参照质粒,以同一对引物在同一反应管中竞争扩增 LARC,从而对 LARC 的表达水平进行定量,建立了定量检测趋化因子 LARC 表达水平的 cQRT-PCR 技术。并通过对已知量的 LARC 水平、HBV 不同感染状态下体外培养细胞及病人活检肝组织标本中 LARC 表达量的研究和测定,验证了本方法具备了较高的可靠性和准确性。

本发明的技术方案是通过以下步骤实现的:

1、构建及鉴定 PAL-2 质粒 自 HepG₂.2.2.15 细胞中扩增得到目的基因 LARC,以 T₄DNA 连接酶克隆到载体 pBS-VH62-ANK 质粒中。以 P₁/P₂ 为引物 (P₂: 5' GTC GAA TTC CAT TCT AGA AAA GCC ACA G 3', P₃: 5' CGG AAT TCC CAT GTG CTG TAC CAA G 3'),自新质粒中扩增出的 PCR 产物,经与 DNA marker、LARC 阳性对照电泳比较,是为 324bp 的目的基因 LARC;进一步以 EcoR I 对质粒进行酶切,产物经电泳分析,证实目的基因已插入到空载体 pBS-VH62-ANK 中;DNA 测序最终确证了上述结果,将该质粒命名为 PAL-2 (P-pBS, A-ANK, L-LARC, 2-HepG₂.2.2.15) (图 1, 2)。

2、构建及鉴定 PAL-2-IS.4 质粒 取人工合成的一对互补的 42bp 外源性核酸片段 IS,退火后形成 Af1 III 粘性末端,以连接酶克隆到经 Af1 III 酶切的质粒载体 PAL-2 中,得到用作内参照的质粒 PAL-2-IS。以 P₁/P₂ 为引物对质粒进行 PCR 初步鉴定,产物与 PAL-2 (324bp),电泳条带比对照 PAL-2 的稍后,提示前者插入了 42bp 的 IS (CATGTAAACATTCTCTTCGACATTCTCTTCAACATTCTCTTC);该质粒可

被 $Afl\ III$ 酶切成线型。最终经测序确认新质粒已插入了 IS 片段，质粒 5' 及 3' 端双侧序列与野生型 LARC 相同，但中间序列多了 42bp，是用于内对照的质粒，命名为 PAL-2-IS.4 (P-pBS, A-ANK, L-LARC, 2-HepG; 2.2.15, IS-Insert Sequence, 4-4 号阳性克隆)。

3、建立检测 LARC 表达的竞争性 RT-PCR 技术 以 $2.50\text{ pg}/10\text{ }\mu\text{l}$ 的 PAL-2 与不同已知浓度的 PAL-2-IS.4 共扩增，产物经琼脂糖凝胶电泳，紫外成像凝胶处理系统扫描分析，结果各个电泳条带的光密度值与 DNA 的起始浓度成正比。根据各扩增条带的光密度值，用光密度比值法，即以参照的不同浓度为横坐标，待测模板与内参照模板光密度扫描值的比值为纵坐标作图，得到一直线回归方程 $y=ax+b$ (图 5)；当 $y=1$ ，即 PAL-2-IS.4 与 PAL-2 扩增产物的光密度值一致时的 x 值，便是待测样品中 LARC cDNA 的起始浓度，计算出的 PAL-2 浓度为 $2.38\text{ pg}/10\text{ }\mu\text{l}$ ，与实际浓度无显著性统计学差异 (95% 可信限)。

4、验证本发明方法的准确性

1) 检测 HBV 不同感染状态下 LARC 表达水平，代表 HBV 不同感染状态的肝细胞分别为：“正常”肝细胞 L02、HBV 慢性持续性感染肝细胞 HepG; 2.2.15，并以 HBV 双体 DNA 体外转染 HepG; 细胞，建立 HBV 短暂(急性)感染肝细胞模型。自 1×10^6 的不同细胞株中抽提到的总 RNA，cQRT-PCR 方法对各株细胞中 LARC 表达的定量结果显示(表 1)：HBV 不同感染状态下 LARC 的表达水平是不同的，分别为：“正常”： $2.65\pm 0.02\text{ pg}/10\text{ }\mu\text{l}/10^6$ 细胞、HBV “急性”感染： $3.43\pm 0.02\text{ pg}/10\text{ }\mu\text{l}/10^6$ 细胞、HBV “慢性”持续感染： $1.22\pm 0.04\text{ pg}/10\text{ }\mu\text{l}/10^6$ 细胞；且这三种状态下 LARC 的表达水平存在显著性差异，即 HBV “急性”感染肝细胞>“正常”肝细胞>HBV “慢性”感染肝细胞 ($p<0.05$)。

2) 检测正常及慢性肝炎活检标本中 LARC 表达量，对数例正常人的肝脏组织标本及经病理诊断证实为慢性乙型肝炎的肝脏活检标本分别抽提总 RNA，在同一 RNA 起始水平，以相同的竞争性 RT-PCR 方法对 LARC mRNA 的表达进行定量，结果表明，慢性乙型肝炎患者肝脏中 LARC 的表达水平呈现出个体差异，其含量界于 $2.372\text{--}4.6\text{ pg}/10\text{ }\mu\text{l}$ 之间，但均普遍显著低于其在正常肝脏组织中的平均表达量 $8.74\text{ pg}/10\text{ }\mu\text{l}$ ($p<0.01$)；提示人体肝脏中存在着基础分泌量的 LARC，HBV 慢性感染状态下，病毒可通过某种途径下调 LARC 的表达。

本发明具有如下特点

- 1、 本发明是一种定量检测 LARC 表达水平的竞争性逆转录 PCR (cQRT-PCR)
- 2、 本发明 RT-PCR 系统中含特定的内参照质粒 (PAL-2-IS.4)

- 3、 该质粒 DNA 内含一比正常 (野生型) LARC 大 42bp, 但其 5' 和 3' 末端序列与 LARC 基因的 5' 和 3' 末端序列同源的特定基因序列
- 4、 本发明 cQRT-PCR 技术可检测包括细胞和组织标本中 LARC 的表达量
- 5、 本方法可用于人、小鼠、大鼠等哺乳类动物 LARC 基因表达水平的检测
- 6、 本方法可用于某些疾病如慢性乙肝等疾病的诊断、预后判断及各种治疗和预防效果的评价

附图说明

图 1 是 质粒 PAL-2 构建示意图: HepG₂. 2. 15 细胞中获得的 LARC 纯化产物与 pBS-VH62-ANK 质粒 DNA 分别经 EcoR I 酶切, 1% 低熔点琼脂糖凝胶电泳后, 回收酶切产物。将得到的两个片段以 T₄ DNA 连接酶连接, 取 5 μ l 连接产物转化感受态菌 DH5 α , 所得质粒命名为 PAL-2。

图 2 是 质粒 PAL-2 的鉴定 Aa.: 以 P₁ 为引物的测序结果; Ab: 以 P₂ 为引物的测序结果; D: PAL-2 的 DNA 序列。

图 3 是内参照质粒 PAL-2-IS 的构建示意图 人工合成一对互补的 42bp 外源性核酸片段 IS, 退火后形成 Af1 III 粘性末端, 利用克隆于 PAL-2 的 LARC 基因内源性 Af1 III 位点经 Af1 III 酶切后, 加入 IS 退火产物, 以 T₄ DNA 连接酶连接, 转化感受态菌 DH5 α , 获得内参照质粒 PAL-2-IS (P-pBS, A-ANK, L-LARC, 2-HepG₂. 2. 15, IS-Insert Sequence)。

图 4 是 质粒 PAL-2-IS. 4 的测序鉴定 粗体为插入片断的 DNA 序列, 下划线为 Af1 III 酶切位点

图 5 是 竞争性定量 RT-PCR 检测 LARC 表达水平在同一 PCR 反应体系中, 同时扩增固定浓度的 PAL-2 和不同浓度梯度的内参照 PAL-2-IS. 4, 两者的共扩增产物电泳后, 对各条带的光密度值进行扫描分析, 得到 PAL-2 的推算浓度。A. PAL-2 与 PAL-2-IS. 4 的共扩增, B. 光密度比值法。

表1 HBV 不同感染状态肝细胞株中 LARC 的表达量

编号	细胞	回归方程	r	p	LARC 的浓度 (pg/10 μ l)
a	L02	$y=0.29x+0.23$	0.96	<0.01	2.65
b	HepG ₂ 2.2.15	$y=0.55x+0.31$	0.94	<0.01	1.22
c	HepG ₂ -2	$y=0.51x-0.16$	0.90	<0.01	2.29
d	HepG ₂ -4	$y=0.37x+0.13$	0.92	<0.01	2.34
e	HepG ₂ -6	$y=0.49x-0.09$	0.90	<0.01	2.23
f	HepG ₂ -7	$y=0.62x-0.47$	0.92	<0.01	2.35
g	HepG ₂ -p ^{DN} -2	$y=0.36x-0.16$	0.93	<0.01	3.21
h	HepG ₂ -p ^{DN} -4	$y=0.35x-0.16$	0.90	<0.01	3.30
i	HepG ₂ -p ^{DN} -6	$y=0.32x-0.09$	0.91	<0.01	3.40
j	HepG ₂ -p ^{DN} -8	$y=0.32x-0.10$	0.91	<0.01	3.47
k	HepG ₂ -p ^{DN} -10	$y=0.32x-0.08$	0.92	<0.01	3.37
l	HepG ₂ -p ^{DN} -12	$y=0.35x-0.13$	0.89	<0.01	3.26

表2 慢性肝炎及正常肝脏标本中 LARC 的表达量

编号	回归方程	r	p	LARC 的浓度 (pg/10ul)	LARC 的起始浓度 (pg/10ul)
a	$y=1.78x-2.26$	0.99	<0.01	1.83	4.575
b	$y=1.72x-0.92$	0.91	<0.01	1.11	2.773
c	$y=1.73x-0.94$	0.90	<0.01	1.13	2.826
d	$y=1.74x-1.99$	0.91	<0.01	1.72	4.3
e	$y=1.37x-0.29$	0.93	<0.01	0.95	2.372
f	$y=1.71x-1.93$	0.89	<0.01	1.71	4.275
g	$y=1.70x-1.88$	0.92	<0.01	1.10	2.74
h	$y=1.52x-0.18$	0.90	<0.01	1.66	4.15
i	$y=1.76x-2.03$	0.91	<0.01	1.75	4.374
j	$y=1.61x-0.70$	0.92	<0.01	1.05	2.629
k	$y=1.47x-1.70$	0.91	<0.01	1.84	4.6
l	$y=0.28x+0.02$	0.95	<0.01	3.54	3.83
m	$y=0.30x-0.06$	0.94	<0.01	3.44	3.6
n	$y=0.30x-0.05$	0.97	<0.01	3.51	3.775

说明书附图

图 1

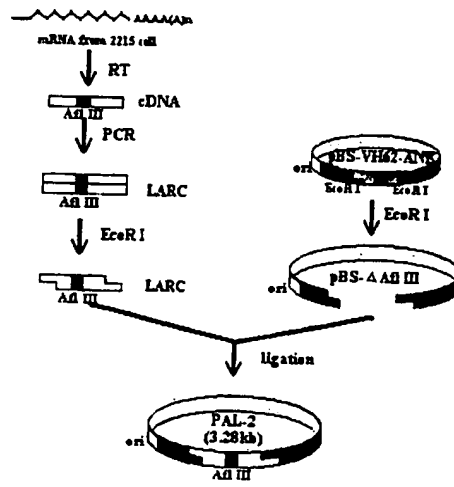
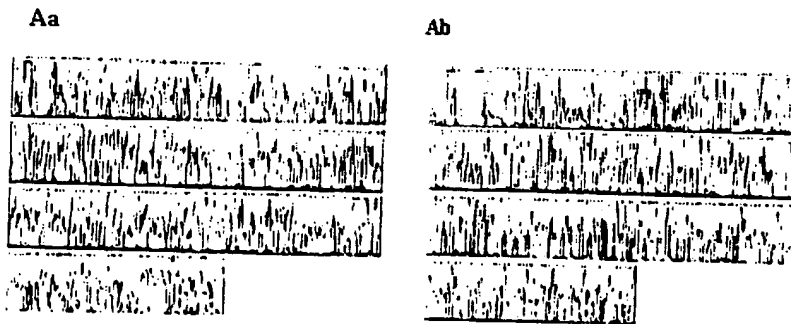


图 2



B
 CGGAATTCCTCC ATGTGCTGTA CCAAGAGTTT GCTCCTGGCT GCTTTGATGT
 CAGTGCTGCT ACTCCACCTC TCGGGCGAAT CAGAGCAGC AAGCAACTTT
 GACTGCTGTC TTGGATACAC AGACCGTATT CTTATCCTA AATTTATTGT
 GGGCTTCACA CGGCAGCTGG CCAATGAAGG CTGTGACATC AATGCTATCA
 TCTTTACAC AAAGAAAAAG TTGTCTGTGT GCGCAATCC AAAACAGACT
 TGGGTGAAAT ATATTGTGCG TCTCCCTCAG TAAAAAAGTC AAGAAACATG
 TAAAAACTGT GGCTTTTATG AATGGAATTC GAC

说明书附图

图 3

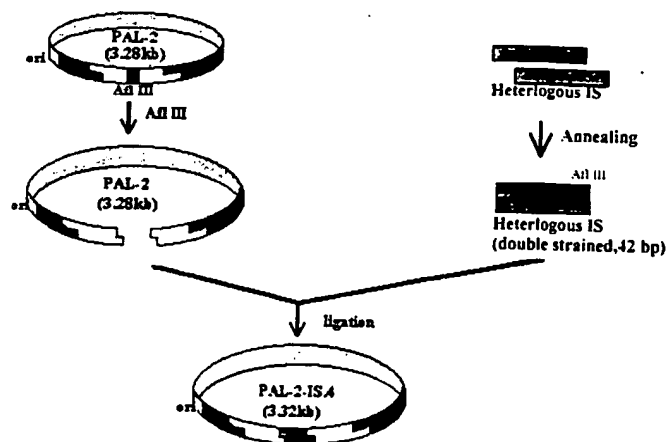


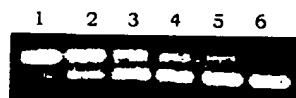
图 4



5' AAGTCAAGAA CAAGTAAACATTCTCTTCGACATTCTCTTC AACATTCTCTTC ATGTAAAACT 3'

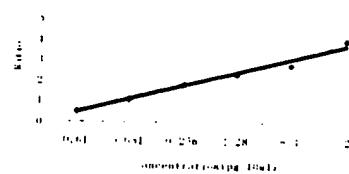
图 5

A



	1	2	3	4	5	6
PAL-2-ISA	32	6.4	1.28	0.256	0.051	0.01 (pg/10 μl)
PAL-2	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5 (pg/10 μl)

B



	1	2	3	4	5	6
PAL-2-ISA	321.0	286.6	235.3	184.7	125.2	74.3
PAL-2	85.2	134.5	198.8	233.3	267.4	318.2
PAL-2/PAL-2-ISA	0.27	0.45	0.86	1.29	2.14	4.14
回归方程	$y = 0.71x - 0.69$ ($r = 0.94$)					
PAL-2 的浓度						
11.1 μl	2.38 pg/10 μl					
12.5 μl	2.50 pg/10 μl					